



PCT/JP 2004/006480

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

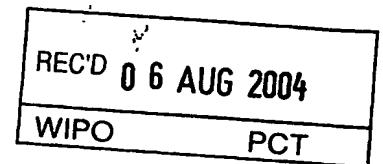
15.06.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 5月 8日

出 願 番 号
Application Number: 特願 2003-129738
[ST. 10/C]: [JP 2003-129738]



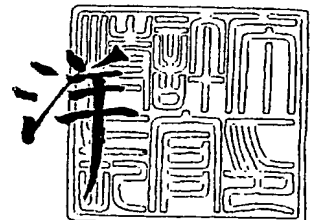
出 願 人
Applicant(s): 東洋紡績株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2004-3063748

【書類名】 特許願

【整理番号】 CN03-0300

【提出日】 平成15年 5月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 19/44

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡績株式会社総合研究所内

【氏名】 西口 進

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡績株式会社総合研究所内

【氏名】 戸田 篤志

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市中央区北 9 条西 1 6 丁目 1 番地 1 号 3 0 2

【氏名】 西村 紳一郎

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区麻生町 7 丁目 1 番地 1 号 3 1 1

【氏名】 山田 久里子

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市中央区北 5 条西 9 丁目 1 2 番地 6 0 1 号

【氏名】 中川 裕章

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代表者】 津村 準二

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-134512

【出願日】 平成14年 5月 9日

**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 000619**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 要約書 1

【その他】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 1 4 年度
新エネルギー・産業技術総合開
発機構「グリコクラス ター制
御生体分子合成技術」委託研究、産業活力再生
特別措置法第 3 0 条の適用を受けるも
の)

【プルーフの要否】 要

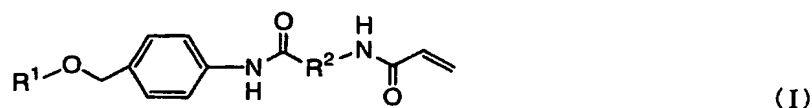
【書類名】 明細書

【発明の名称】 オリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式 (I) (式中、 R^1 は単糖残基あるいはオリゴ糖残基、 R^2 はメチレン基 4～20 個分の長さを有するリンカーを示す) で表されるアクリルアミド誘導体と少なくとも 1 種類のビニル系単量体とからなる共重合体で、一般式 (I) で表されるアクリルアミド誘導体が全ビニル系共重合体中 10 モル%以下であるオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー。

【化 1】



【請求項 2】 前記一般式 (1) の R^1 が N-アセチルグルコサミン残基、グルコース残基又はラクトース残基である請求項 1 に記載のオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー。

【請求項 3】 前記一般式 (1) の R^2 がベンチレン基である請求項 1 又は 2 に記載のオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー。

【請求項 4】 前記ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる請求項 1 乃至 3 に記載のオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー。

【請求項 5】 オリゴ糖の製造方法であって、

(工程 1) 請求項 1 に記載の水溶性高分子プライマーに糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素と接触させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該水溶性高分子プライマーに転移させる工程、

(工程 2) 工程 1 を 1 回または 2 回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、

(工程 3) 必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、

(工程 4) 工程 1～工程 3 を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した水溶性高分子プライマーからオリゴ糖を遊離させる工程、を含むことを特徴とするオリゴ糖の製造方法。

【請求項 6】 水溶性高分子プライマーより伸長した糖鎖を遊離させる工程が接触水素化分解あるいは 2, 3-ジクロロ-5, 6-ジシアノベンゾキノンによる酸化工程である請求項 5 に記載のオリゴ糖の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、オリゴ糖製造に有用な水溶性高分子プライマーおよび該水溶性高分子プライマーを用いたオリゴ糖の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖は核酸や蛋白質と並んで生体を構成する主要な成分であるが、核酸や蛋白質と比べ、その構造あるいは機能はあまりよく理解されていない。糖は、通常糖鎖と呼ばれる重合体を形成し、さらにそれらが蛋白質や脂質と結合して糖蛋白質、糖脂質あるいはプロテオグリカンと総称される極めて複雑な複合分子を形成している。さらに、核酸あるいは蛋白質がその構成単位であるヌクレオチドあるいはアミノ酸が直線的に結合した高分子であるのに対して、糖鎖は分子内に複数の分岐点があるばかりでなく、その構成単位である単糖の結合様式も多様であるため、その構造は核酸や蛋白質と比較にならないほど複雑である。これら構造の複雑さは、この分野の研究を遅らせている大きな原因の一つとなっている。

【0003】

しかし、近年糖鎖が細胞認識、免疫、分化、受精、老化、ガン化などに関与することが徐々にわかってくるにつれて、非常に注目される研究分野となってきた。このような現状より、天然の構造を有する糖鎖や新規な糖鎖を合成する試みが盛んになされている。このような状況から、天然の構造を有する糖鎖や新規な糖鎖を合成する試みが盛んになされている。核酸や蛋白質については自動合成技術が確立されており、このことにより、この分野の研究が著しく進歩したことは誰

もが認めるところであり、糖鎖についても、その自動合成技術の確立は切望されている。

【0004】

これまでに糖鎖の自動合成を試みたいいくつかの報告があり、その手法は大きく分けて2つある。1つは化学合成によるものであるが、糖残基と糖残基を立体選択的に結合させる方法が十分確立されておらず、さらに保護基を結合させたり、あるいは脱離させたりと工程が煩雑であるという問題がある。

【0005】

もう1つは酵素合成によるものであり、保護基を必要とせず、また糖残基と糖残基を立体選択的に結合させることができるので化学合成に比べ、非常に有利であり、近年いくつかの方法が提案されるようになってきた。これには、最近各種糖転移酵素の遺伝子が単離され、遺伝子組換え技術による糖転移酵素の大量生産が可能になってきたという背景がある。また、自動合成では通常反応開始点となる糖残基を特定の担体に特定の条件で開裂することのできるリンカーを介して結合されたもの（プライマーとも呼ばれる）を出発物質として用いるが、リンカーの種類により、オリゴ糖、配糖体、糖ペプチドなど種々の形で担体より遊離される。しかしながら、合成した糖鎖化合物を種々の用途に利用することを考えると、やはりオリゴ糖が最も好ましい。

【0006】

糖転移酵素を用いた糖鎖の自動合成の例としては、U. Zehaviらは、アミノエチル基あるいはアミノヘキシル基を結合させたポリアクリルアミドゲルを固相担体とした糖転移酵素による固相合成を報告している（例えば、非特許文献1参照）。この方法は、適当な単糖を4-カルボキシー-2-ニトロベンジルグリコシドとした後、上記担体のアミノ基と結合させたものをプライマーとし、糖転移酵素により糖鎖伸長反応を行ない、その後光分解により伸長させた糖鎖をオリゴ糖として遊離させるというものである。しかしながら、糖転移酵素による糖転移収率は低く、10%にも満たない。

【0007】

これまで、糖転移酵素は固相担体上に結合させた糖あるいはオリゴ糖とはあま

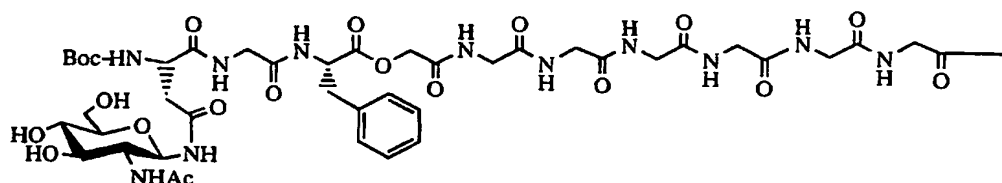
り反応せず、糖鎖伸長反応を効率よく行うことは困難であるとされてきたが、U. Zehaviらは、4-カルボキシ-2-ニトロベンジルグリコシドと固相担体との間をヘキサメチレン基やオクタメチレン基など鎖長の長いリンカーで結合させることにより、糖転移収率を最大51%まで向上したと報告している（例えば、非特許文献2参照）。しかしながら、この方法においても収率的には十分なレベルとは言えない。

【0008】

その他の例として、C.-H. Wongらは、アミノ化シリカに下記化2（式中、Acはアセチル基、Bocはt-ブトキシカルボニル基を示す）の基を結合させたものをプライマーとし、糖転移酵素を用いて糖鎖を伸長させた後、 α -キモトリプシンの加水分解作用を利用し伸長させた糖鎖を糖ペプチドの形で切り出す方法を報告している（例えば、非特許文献3参照）。しかしながら、糖転移酵素による糖鎖伸長反応の収率は55～65%であり、とても十分なものとは言えない。

【0009】

【化2】

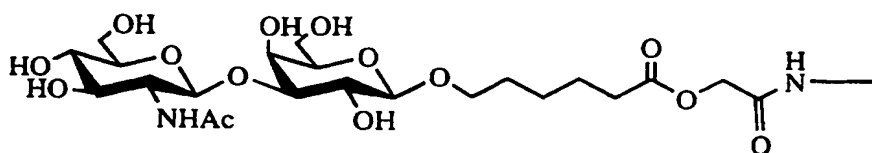


【0010】

また、C.-H. Wongらは、固相担体であるアミノ化シリカに結合させる基を下記化3（式中、Acはアセチル基を示す）に改良し、糖転移酵素により糖鎖を伸長させた後、ヒドラジン分解により糖鎖を遊離させる方法を報告しており、酵素による糖転移反応をほぼ定量的に行うことができたとも報告している（例えば、非特許文献4参照）。この方法によれば、伸長した糖鎖は6-カルボヒドラジドヘキサノール配糖体として遊離される。

【0011】

【化3】

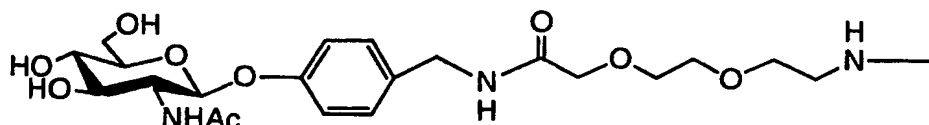


【0012】

さらに、C.-H. Wongらは、アクリルアミド-アクリル酸-N-イソプロピルアクリルアミド共重合体のアクリルアミド残基に下記化4（式中、Acはアセチル基を示す）の基を結合させた水溶性のポリマーをプライマーとし、糖転移酵素により糖鎖を伸長させた後、硝酸二アンモニウムセリウム(IV)により遊離させる方法を報告している（例えば、非特許文献5参照）。この方法によれば、酵素による糖転移反応は80～90%の収率で進行し、伸長した糖鎖はp-ホルミルフェノール配糖体として遊離される。

【0013】

【化4】



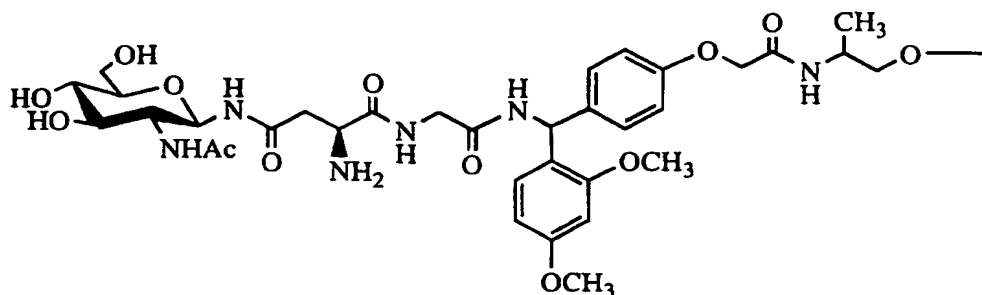
【0014】

また、M. Meldalらは、ジアミノ化ポリエチレングリコールのモノおよびジアクリロイル化体の重合体ゲルに、下記化5（式中、Acはアセチル基を示す）の基を結合させたものをプライマーとし、糖転移酵素を用いて糖鎖を伸長させた後、トリフロロ酢酸により糖鎖を糖ペプチドとして遊離させる方法を報告しており、糖転移反応もほぼ定量的に進行したと報告している（例えば、非特許文献6参照）。この方法で得られる糖ペプチドのペプチド鎖はAsn（アスパラギン）-

Gly (グリシン) であり、C末側のグリシン残基はグリシンアミド残基となっており、通常の糖ペプチドとは異なる。

【0015】

【化5】

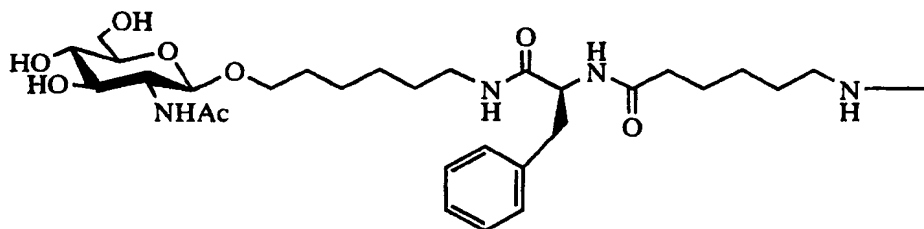


【0016】

さらに、本発明者らがポリアクリルアミドのアミド態窒素原子に、下記化6 (式中、Acはアセチル基を示す) に示した基を結合させたものをプライマーとし、糖転移酵素を用いて糖鎖を伸長させた後、 α -キモトリプシンの加水分解作用を利用して伸長させた糖鎖を遊離させる方法を報告している(例えば、非特許文献7参照)。本方法によれば、酵素による糖転移反応は定量的に進行し、伸長した糖鎖は6-アミノヘキサノール配糖体として得られる。

【0017】

【化6】



【0018】

上述したこれらの方法は、いずれも得られる糖鎖化合物がオリゴ糖ではないこと、必ずしも糖転移反応の収率が十分でないことが欠点として挙げられる。また

、遺伝子組換えにより大量生産が可能になってきたとはいえ、まだまだ糖転移酵素は非常に高価であり、繰り返して使用できる固定化糖転移酵素の利用が望まれるが、上記の方法のうちのいくつかは不溶性担体上で糖鎖伸長反応を行うため、固定化糖転移酵素を利用できないという欠点もある。固定化糖転移酵素を利用するためには、不溶性担体ではなく、水溶性担体上で糖鎖伸長反応を行う必要がある。

【0019】

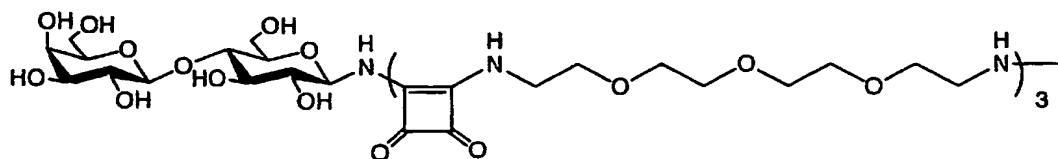
S. Rothらは、まず、糖転移酵素の糖受容体を固相担体に結合させ、これをアフィニティ吸着体とし、この糖受容体と結合することのできる糖転移酵素を含む組織抽出液を接触させることにより、糖転移酵素をアフィニティ吸着体に結合させる。次いで、この糖転移酵素が結合したアフィニティ吸着体をこの糖転移酵素が糖供与体として利用できる糖ヌクレオチドを含む溶液と接触させることにより、糖転移酵素をアフィニティ吸着体から遊離させるとともに糖受容体に糖残基を一つ伸長させ、さらに、この糖残基が一つ伸長した糖受容体と結合することのできる糖転移酵素を含む組織抽出液を接触させ、同様のことを繰り返し所望の糖鎖を固相担体上に合成する方法を開示している（例えば、特許文献1参照）。しかしながら、この方法の有用性を示す具体的なデータは示されておらず、得られた糖鎖を固相担体から遊離させる方法も開示されていない。

【0020】

糖転移酵素を用いた糖鎖の自動合成であり、得られる糖鎖化合物がオリゴ糖である例としては、T. NorbergらがSephacrose 6B(アマシャムファルマシア社製)に下記化7に示した基を結合させたものをプライマーとし、糖転移酵素を用いて糖鎖を伸長させた後、臭素あるいはアンモニア/硼酸アンモニウムにより伸長させた糖鎖を遊離させる方法を報告している（例えば、非特許文献8参照）。酵素による糖転移反応は定量的に進行しており、収率的には問題はないが、プライマーを製造に高価な3, 4-ジエトキシー-3-シクロブテン-1, 2-ジオンを用いており、経済的ではない。また、不溶性担体上での糖鎖伸長反応を行うため、固定化糖転移酵素を利用できないという欠点もある。

【0021】

【化7】

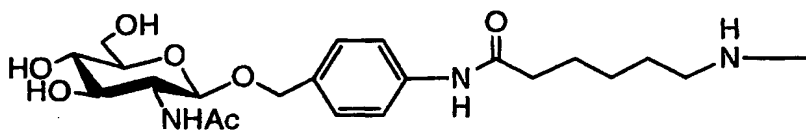


【0022】

また、本発明者らはポリアクリルアミド中のアミド態窒素原子の5個に1個の割合で、下記化8（式中、Acはアセチル基を示す）に示した基を結合させたものをプライマーとし、糖転移酵素を用いて糖鎖を伸長させた後、水素化分解により伸長させた糖鎖を遊離させる方法を報告している（例えば、非特許文献9、10参照）。本方法によれば、酵素による糖転移反応は定量的に進行するが、後述するようにそれは遊離酵素の場合であり、固定化酵素では必ずしもそのようには進行しない。

【0023】

【化8】



【0024】

【特許文献1】

特表平5-500905号公報

【0025】

【非特許文献1】

Carbohydr. Res., 124, 23 (1983), Carbohydr. Res., 228, 255 (1992)

【0026】

【非特許文献2】

React. Polym., 22, 171 (1994), Carbohydr. Res., 265, 161 (1994)

【 0 0 2 7 】

【非特許文献 3】

J. Am. Chem. Soc., 116, 1136 (1994)

【 0 0 2 8 】

【非特許文献 4】

J. Am. Chem. Soc., 116, 11315 (1994)

【 0 0 2 9 】

【非特許文献 5】

Adv. Synth. Catal., 343, 675 (2001)

【 0 0 3 0 】

【非特許文献 6】

J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1849 (1994)

【 0 0 3 1 】

【非特許文献 7】

Tetrahedron Lett., 36, 9493 (1995) 、 Carbohydr. Res., 305, 443 (1998)

【 0 0 3 2 】

【非特許文献 8】

Carbohydr. Res., 319, 80 (1999)

【 0 0 3 3 】

【非特許文献 9】

Tetrahedron Lett., 35, 5657 (1994)

【 0 0 3 4 】

【非特許文献 1 0】

Carbohydr. Res., 305, 443 (1998)

【 0 0 3 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、オリゴ糖の自動合成に適したプライマーを提供することにある。

【0036】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは前記問題点を解決するために鋭意検討した結果、一般式 (I) (式中、 R^1 は単糖残基あるいはオリゴ糖残基、 R^2 はメチレン基4～20個分の長さを有するリンカーを示す) で表されるアクリルアミド誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体とを該アクリルアミド誘導体の含有率が10%以下になるように共重合することにより、上記問題点を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0037】

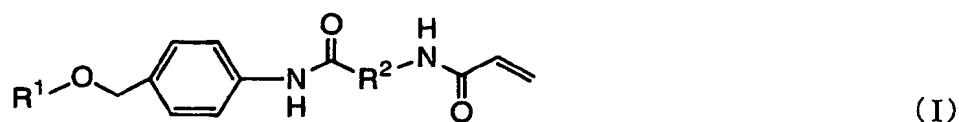
すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

【0038】

(1) 一般式 (I) (式中、 R^1 は単糖残基あるいはオリゴ糖残基、 R^2 はメチレン基4～20個分の長さを有するリンカーを示す) で表されるアクリルアミド誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体とからなる共重合体で、一般式 (I) で表されるアクリルアミド誘導体が全ビニル系共重合体中10モル%以下であるオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー。

【0039】

【化9】



【0040】

(2) R^1 がN-アセチルグルコサミン残基、グルコース残基、ラクトース残基である (1) のオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー

【0041】

(3) R^2 がペンチレン基である (1) 又は (2) のオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー。

【0042】

(4) ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる (1) 乃至 (3) のオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー。

【0043】

(5) オリゴ糖を製造する方法であって、

(工程 1) (1) の水溶性高分子プライマーに糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素と接触させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該水溶性高分子プライマーに転移させる工程、

(工程 2) 工程 1 を 1 回または 2 回以上繰り返して糖鎖を伸長させる工程、

(工程 3) 必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する工程、および、

(工程 4) 工程 1 ～工程 3 を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した水溶性高分子プライマーからオリゴ糖を遊離させる工程、を含むことを特徴とするオリゴ糖を製造する方法。

【0044】

(6) 水溶性高分子プライマーより伸長した糖鎖を遊離させる工程が接触水素化分解あるいは 2, 3-ジクロロ-5, 6-ジシアノベンゾキノンによる酸化工程である (5) のオリゴ糖を製造する方法。

【0045】

【発明の実施の形態】

本発明のオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマーは、一般式 (I) で表されるアクリルアミド誘導体と少なくとも 1 種類のビニル系単量体とからなる共重合体で、一般式 (I) で表されるアクリルアミド誘導体が全ビニル系共重合体中 10 モル%以下のものであり、式中 R^1 は単糖残基あるいはオリゴ糖残基、 R^2 はメチレン基 4 ～ 20 個分の長さを有するリンカーを示す。

【0046】

R^1 の単糖残基あるいはオリゴ糖残基としては、特に制限はなく、グルコース

残基、ガラクトース残基、マンノース残基、N-アセチルグルコサミン残基、N-アセチルガラクトサミン残基、キシロース残基、ラクトース残基、N-アセチルラクトサミン残基、キトビオース残基などが挙げられる。

【0047】

R²のリンカーとしては、例えばブチレン基、ペンチレン基、ヘプチレン基、ドデシレン基などが挙げられる。

【0048】

本発明のオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマーは、一般式(I)で表されるアクリルアミド誘導体少なくとも1種類のビニル系単量体との共重合により得ることができ、そのときの一般式(I)で表されるアクリルアミド誘導体の全ビニル系共重合体中に占める割合は10%以下であり、好ましくは1~10%であり、さらに好ましくは2~5%である。

【0049】

上記の共重合は、特に限定されるものではなく、例えばラジカル重合、カチオン重合、アニオン重合などの手法を用いることにより行うことができ、通常ペルオキシ二硫酸アンモニウムなどを触媒とするラジカル重合を用いることにより好適に行うことができる。

【0050】

上記のビニル系単量体は、特に限定されるものではなく、例えばアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類が挙げられる。アクリルアミド類としては、アクリルアミドやN-メチルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミドなどのN-アルキルアクリルアミド類などが例示される。メタクリルアミド類としてはメタクリルアミド、N-メチルメタクリルアミドやN-イソプロピルメタクリルアミドなどのN-アルキルメタクリルアミド類などが例示される。アクリル酸エステル類としてはアクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸ヒドロキシエチル、アクリル酸ジメチルアミノエチルなどが例示される。メタクリル酸エステル類としてはメタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、

メタクリル酸ジメチルアミノエチルなどが例示される。スチレン類としてはスチレン、p-ヒドロキシスチレンなどが例示される。脂肪酸ビニルエステル類としては酢酸ビニル、酪酸ビニルなどが好適に用いられる。

【0051】

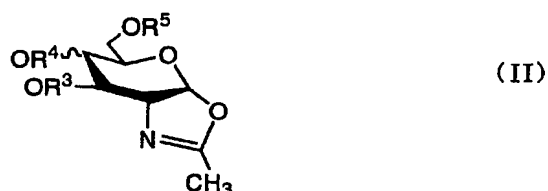
共重合体の一般的な分子量は約10000～約5000000であり、好ましくは20000～2000000、より好ましくは50000～1000000である。

【0052】

前記一般式(I)で表されるアクリルアミド誘導体は、通常用いられている各種有機合成化学的な手法により合成することができる。例えば、一般式(II)で表される糖オキサゾリン誘導体、一般式(III)で表されるハロゲン化糖あるいはトリクロロアセトイミデート誘導体とp-ニトロベンジルアルコールとを適当な触媒存在下で縮合させた後、ニトロ基を還元してアミノ基へと変換する。その後、一般式(IV)で表される ω -アミノ脂肪酸と塩化アクリロイルとの縮合により得られる一般式(V)で表されるアクリルアミド誘導体と上記化合物とを適当な縮合剤存在下、縮合させることにより得られる。

【0053】

【化10】



(式中、 R^3 、 R^4 および R^5 はそれぞれ独立して、アシル型保護基あるいはアシル型保護基で水酸基が保護された単糖残基あるいはオリゴ糖残基を示す。)

【0054】

【化 1 1】



(式中、XはF、Cl、BrまたはOC(NH)CCl₃、R⁶は、NHCOCH₃またはOR¹⁰で表される基、R⁷、R⁸、R⁹およびR¹⁰はそれぞれ独立して、アシル型保護基あるいはアシル型保護基で水酸基が保護された単糖残基あるいはオリゴ糖残基を示す。)

【0055】

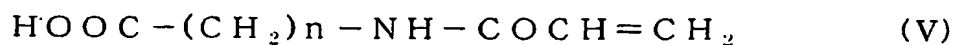
【化 1 2】



(式中、nは4～20の整数を示す。)

【0056】

【化 1 3】



(式中、nは4～20の整数を示す。)

【0057】

本発明のオリゴ糖製造方法の第1工程は、水溶性高分子プライマーに糖ヌクレオチドの存在下に糖転移酵素と接触させることにより、糖ヌクレオチドより糖残基を該水溶性高分子プライマーに転移させる。

【0058】

糖ヌクレオチドより水溶性高分子プライマーへの糖の転移は、通常水溶性高分子プライマーと糖ヌクレオチドとを含む中性の緩衝液中で、10～60℃、好ま

しくは20～40℃で、1～120時間、好ましくは2～72時間、糖転移酵素と接触させることにより行われる。

【0059】

また、反応液中には必要に応じて金属塩を添加してもよい。添加できる金属イオンとしては、例えば、マグネシウム、マンガン、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛などがあり、通常塩化物等の形で添加することができる。

【0060】

本発明で用いる糖転移酵素は、糖ヌクレオチド類を糖供与体として利用できるものであればよく特に限定されない。このような酵素としてLeloir経路の糖転移酵素類を挙げることができる。例えば、ガラクトース転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素、N-アセチルガラクトサミン転移酵素、フコース転移酵素、シアル酸転移酵素、マンノース転移酵素、キシロース転移酵素、グルクロン酸転移酵素などが挙げられる。なお、これらの酵素は遊離酵素であっても、固定化酵素であっても構わないが、固定化酵素が好ましい。

【0061】

本発明で用いる糖ヌクレオチド類は、上記酵素が利用できるものであれば特に限定されない。例えば、ウリジン-5'-ジリン酸ガラクトース、ウリジン-5'-ジリン酸-N-アセチルグルコサミン、ウリジン-5'-ジリン酸-N-アセチルガラクトサミン、ウリジン-5'-ジリン酸グルクロン酸、ウリジン-5'-ジリン酸キシロース、グアノシン-5'-ジリン酸フコース、グアノシン-5'-ジリン酸マンノース、シチジン-5'-モノリン酸-N-アセチルノイラミン酸およびこれらのナトリウム塩などが挙げられる。

【0062】

本発明のオリゴ糖製造方法の第2工程は、工程1を1回または2回以上繰り返して、複数の糖残基を転移させることにより、糖鎖を伸長させる。

【0063】

本発明のオリゴ糖製造方法の第3工程は、必要に応じて、副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類を除去する。副生したヌクレオチド類や未反応の糖ヌクレオチド類などを除去する方法は、水溶性高分子プライマーとヌクレオ

チド類および糖ヌクレオチド類などを分離できる方法であれば特に限定されない。例えば、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、透析、限外ろ過などにより除去することができる。

【0064】

本発明のオリゴ糖製造方法の第4工程は、工程1～工程3を複数回繰り返した後、複数の糖残基が転移して糖鎖が伸長した水溶性高分子プライマーからオリゴ糖を遊離させる。本発明の水溶性高分子プライマーより、伸長した糖鎖を遊離させる方法としては、伸長した糖鎖を分解することなく、オリゴ糖して遊離させることのできる方法であれば、特に制限はないが、例えば接触水素化分解や2, 3-ジクロロ-5, 6-ジシアノベンゾキノンによる酸化反応などが挙げられる。

【0065】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲はかかる実施例に何ら限定されるものではない。

【0066】

参考例1 2-メチル- (3, 4, 6-トリ-*O*-アセチル-1, 2-デオキシ- α -D-グルコピラノ) - [2, 1-d] - 2-オキサゾリンの合成

2-アセトアミド-1, 3, 4, 6-テトラ-*O*-アセチル-2-デオキシ-D-グルコピラノシド6.0gを1, 2-ジクロロエタン40mlに溶かし、ここにトリメチルシリルトリフロロメタンスルホン酸3.2mlを加え、50℃で7時間攪拌しながら反応させた。反応後、室温まで冷却した後、トリエチルアミン10.8mlを加えた。反応液を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出液；トルエン：酢酸エチル：トリエチルアミン＝100：200：1）で目的物を分離し、目的物を5.0g得た。

【0067】

参考例2 p-ニトロベンジル-2-アセトアミド-3, 4, 6-トリ-*O*-アセチル-2-デオキシ-D-グルコピラノシドの合成

参考例1で得た2-メチル- (3, 4, 6-トリ-*O*-アセチル-1, 2-デオキシ- α -D-グルコピラノ) - [2, 1-d] - 2-オキサゾリン2.8

g をジクロロエタン 40 ml に溶解し、ここに p-ニトロベンジルアルコール 10.4 g と D-カンファー-10-スルホン酸 0.2 g を加え、80℃ で 2 時間攪拌しながら反応させた。反応後、室温まで冷却し、トリエチルアミン 4.0 ml を加えた。反応液を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出液；クロロホルム：酢酸エチル：メタノール＝200：40：5）で目的物を分離し、目的物を 3.7 g 得た。

【0068】

参考例 3 6-アクリロイルアミノカプロン酸の合成

6-アミノカプロン酸 10.0 g を 1.27 M 水酸化ナトリウム水溶液 60 ml に溶解し、塩化アクリロイル 7.8 ml を 20 ml のテトラヒドロフランに溶かしたものを氷冷下で滴下した。このとき、pH 8～9 になるように 4 N 水酸化ナトリウム水溶液を用いて調整した。滴下後、徐々に室温に戻しながら 2 時間攪拌した。次いで、反応液に 1 N 塩酸を pH 3 になるまで加えた後、酢酸エチルで生成物を抽出した。抽出液を水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。

硫酸マグネシウムをろ別し、ろ液を減圧濃縮した。残渣を少量の酢酸エチルに溶かし、ヘキサンで再結晶し、目的物 9.6 g を得た。

【0069】

参考例 4 p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル)アミノ-ベンジル-2-アセトアミド-3,4,6-トリ-O-アセチル-2-デオキシ-D-グルコピラノシドの合成

参考例 2 で得た p-ニトロベンジル-2-アセトアミド-3,4,6-トリ-O-アセチル-2-デオキシ-D-グルコピラノシド 1.6 g をメタノール 50 ml に溶解し、ここにギ酸アンモニウム 2.1 g および 10% パラジウム-炭素 170 mg を加えた。室温で 5 分間攪拌した後、触媒をろ別し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をクロロホルムで溶解した。蒸留水で有機層を洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥後、硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を減圧濃縮した。残渣をジクロロエタン：N,N-ジメチルホルムアミド＝10：1 の混合溶媒 44 ml で溶かし、ここに参考例 3 で得た 6-アクリロイルアミノカプロン酸 0.6 g を加えた。さらに、トリエチルアミン 0.46 ml と 1-(3-ジメチル

アミノプロピル) - 3-エチルカルボジイミド塩酸塩 65 mg を 0℃ で攪拌しながら加えた。攪拌しながら室温まで戻し、22 時間反応させた。反応液にクロロホルム 60 ml を加え、1 N 水酸化ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ別し、ろ液を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出液；クロロホルム：エタノール＝30：1）で目的物を分離し、目的物を 1.1 g 得た。

【0070】

実施例 1 p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル) アミノ-ベンジル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシドの合成

参考例 4 で得た p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル) アミノ-ベンジル-2-アセトアミド-3, 4, 6-トリ-O-アセチル-2-デオキシ-D-グルコピラノシド 660 mg をメタノール 70 ml に溶解し、ここにナトリウムメトキシド 50 mg を加え、室温で攪拌しながら 15 時間反応させた。反応後、H⁺型の陽イオン交換樹脂 Dowex 50WX-8（ダウケミカル社製）を pH 7 になるまで加えた。イオン交換樹脂をろ別し、ろ液を減圧濃縮し、目的物を 520 mg 得た。

【0071】

実施例 2 p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル) アミノ-ベンジル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシド-アクリルアミド共重合体（共重合比 1：10、プライマー A）の合成

実施例 1 で得た p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル) アミノ-ベンジル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシド 62 mg とアクリルアミド 89 mg をジメチルスルホキシド：蒸留水＝3：1 の混合溶媒 1 ml に溶解し、アスピレーターで十分に脱気した後、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（以下、TEMED と略する）13.8 μl と過硫酸アンモニウム 8.4 mg を加え、室温で 24 時間攪拌し重合させた。反応後、反応液に蒸留水 2 ml を加え、Sephadex G-50（アマシャムファルマシア社製）を用いたカラムクロマトグラフィー（溶出液：50 mM 酢酸アンモニウム）により目

的物を分離した。得られた目的物画分を凍結乾燥し、目的物 120 mg を得た。

【0072】

実施例 3 p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル) アミノ-ベンジル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシド-アクリルアミド共重合体 (共重合比 1:20、プライマー B) の合成

アクリルアミド 178 mg、TEMED 26.3 μ l、過硫酸アンモニウム 16.1 mg を用いて実施例 2 と同様の方法で目的物 194 mg を得た。

【0073】

実施例 4 p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル) アミノ-ベンジル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシド-アクリルアミド共重合体 (共重合比 1:50、プライマー C) の合成

アクリルアミド 446 mg、TEMED 63.8 μ l、過硫酸アンモニウム 39.1 mg を用いて実施例 2 と同様の方法で目的物 410 mg を得た。

【0074】

参考例 5 p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル) アミノ-ベンジル-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシド-アクリルアミド共重合体 (共重合比 1:5、プライマー D) の合成

アクリルアミド 45 mg、TEMED 7.5 μ l、過硫酸アンモニウム 4.6 mg を用いて実施例 2 と同様の方法で目的物 89 mg を得た。

【0075】

実施例 5 β 1, 4-ガラクトース転移酵素による各種プライマーへのガラクトース転移

β 1, 4-ガラクトース転移酵素 (東洋紡績社製) 1 U、ウリジン-5'-ジホスホガラクトース 10 mM、塩化マンガン 10 mM、 α -ラクトアルブミン 0.26 mg/ml を含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 2.0 ml に実施例 2~4 および参考例 5 で得たプライマー A~D をそれぞれ 20 mg 加え、37℃で24時間反応させた。反応後、100℃で3分間加熱することにより反応を停止させた。反応液を遠心分離して得られた上清より、Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィー (溶出液: 蒸留水) で生成物画分を分離し、凍結乾燥する

ことにより生成物 19 mg を得た。得られた生成物の¹H-NMRスペクトルを測定し、そのスペクトルよりガラクトースの転移がいずれも定量的に進行していることを確認した。

【0076】

参考例 6 固定化 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素の調製

NHS活性化Sepharose (アマシャムファルマシア社製) 0.5 g をとり、1 mM 塩酸 100 ml を 3 回に分けて洗浄した。これにブタ肝臓由来 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素 1 U、シチジン-5'-ジホスフェート 1 mM を含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 5 ml を加え、4℃で一晩、穏やかに振とうした。固定化 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素をガラスフィルターでろ別し、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素を除く上記緩衝液 5 ml で洗浄した。0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 5 ml を加え、担体中の未反応の活性化基をブロックし、さらに洗浄した後、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素をシチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸 (以下、CMP-NeuAc と略する) 1 mM を含む 25 mM カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) 中に浸漬し、4℃で保存した。

【0077】

実施例 6 固定化 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素による各種プライマーへのシアル酸転移

参考例 6 で得た固定化 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素 0.2 ml、CMP-NeuAc 50 mM、塩化マンガン 10 mM を含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) 1.0 ml に実施例 5 で得たガラクトシル化されたプライマー A~D をそれぞれ 6.8 mg、10.4 mg、21.0 mg、5.1 mg (N-アセチルラクトサミン残基で 5 μ mol に相当) 加え、30℃で 24 時間振とうしながら反応させた。反応後、遠心分離することにより反応液を上清として得た後、実施例 5 と同様の方法で生成物を分離し、生成物をそれぞれ 5 mg、8 mg、17 mg、4 mg 得た。生成物の¹H-NMRスペクトルを測定し、そのスペクトルよりシアル酸転移反応の収率を求めたところ、プライマー A は 84%、プライマー B は 98%、プライマー C は 97%、プライマー D は 56% であった。その結果、プライマー中の糖残基の密度が高すぎると、反応収率が低下することが確認

された。

【0078】

実施例7 プライマーからの糖鎖の遊離

実施例6でシアル酸を転移させたプライマーA 5 mgを蒸留水：エタノール＝3：1の混合溶媒 1 mlに溶かし、ここに10%パラジウム－炭素 1 mgを加え、常圧下水素ガスにより室温で24時間接触還元した。触媒をろ別した後、ろ液を限外ろ過ユニットウルトラフリーMC（分画分子量10,000、ミリポア社製）でろ過し、通過液画分として遊離させたオリゴ糖を集めた。通過液画分を凍結乾燥し、オリゴ糖 1.7 mgを得た。得られたオリゴ糖の¹H-NMRスペクトルを測定し、そのスペクトルより得られたオリゴ糖が目的である α 2,3-シアリル-N-アセチラクトサミンであることを確認した。

【0079】

参考例7 p-ニトロベンジル2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D-ガラクトシル-2,3,6-トリ-O-アセチル-D-グルコピラノシドの合成

1-ブロモ-2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D-ガラクトシル-2,3,6-トリ-O-アセチル-D-グルコピラノシド 5.0 gをジクロロエタン 50 mlに溶解し、ここにp-ニトロベンジルアルコール 23.5 gとモレキュラーシーブス 4Aを5.0 g加え0℃で攪拌した。窒素気流下で銀トリフレート 2.9 g加えて徐々に室温に戻しながら12時間攪拌しながら反応させた。

反応液をクロロホルムで希釈してセライトパッド上で濾過したのち、ろ液を飽和食塩水で洗浄し、有機層を無水硫酸マグネシウム上で乾燥させた。ろ過により硫酸マグネシウムを除去し、ろ液を減圧下で濃縮したのち、シリカゲルクロマトグラフィー（溶出液；クロロホルム：メタノール＝50：1）で目的物を分離し、目的物を5.6 g得た。

【0080】

参考例8 p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル)-ベンジル-2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D-ガラクトシル-2,3,6-トリ-O-アセチル-D-グルコピラノシドの合成

参考例7で得たp-ニトロベンジル2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-

D-ガラクトシル-2, 3, 6-トリ-O-アセチル-D-グルコピラノシド 3.0 g をメタノール 50 ml に溶解し、ここにギ酸アンモニウムを 1.8 g および 10% パラジウム-炭素を 200 mg を加えた。室温で 5 分間攪拌した後、触媒をろ別し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をクロロホルムで溶解した。蒸留水で有機層を洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥後、硫酸マグネシウムをろ別した後、ろ液を減圧濃縮した。残渣をジクロロエタン:N,N-ジメチルホルムアミド=10:1 の混合溶媒 40 ml で溶かし、ここで参考例 3 で得た 6-アクリロイルアミノカプロン酸を 0.85 g 加えた。続いてトリエチルアミン 634 μ l と 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 870 mg を加えて氷冷から室温に戻しながら 22 時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈し、1 N 硫酸および飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、有機層を無水硫酸マグネシウム上で乾燥させた。濾過により硫酸マグネシウムを除去し、ろ液を減圧下で濃縮したのち、シリカゲルクロマトグラフィー（溶出液；クロロホルム：エタノール=20:1）で目的物を分離し、目的物を 1.1 g 得た。

【0081】

実施例 8 p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル)-ベンジル-D-ガラクトシル-D-グルコピラノシドの合成

参考例 8 で得た p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル)-ベンジル-2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-D-ガラクトシル-2, 3, 6-トリ-O-アセチル-D-グルコピラノシド 1.0 g をメタノール 10 mL に溶解させた。そこにナトリウムメトキシド 24 mg を加え室温で 15 時間攪拌した。

反応終了後、反応液をイオン交換樹脂ダウエックス 50W-X8 (H+) で中和した。樹脂をろ別し、ろ液を減圧濃縮し、目的物を 650 mg 得た。

【0082】

実施例 9 p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル)-ベンジル-D-ガラクトシル-D-グルコピラノシド-アクリルアミド共重合体（共重合比 1:2.0、プライマー E）の合成

実施例 8 で得た p-N-(6-アクリロイルアミノヘキサノイル)-ベンジル

—D—ガラクトシル—D—グルコピラノシド 61.5 mg、アクリルアミド 142.2 mg をジメチルスルホキシド：蒸留水＝3：1 の混合溶媒 2 ml に溶解し、TEMED 19.5 μ l と過硫酸アンモニウム 15.3 mg を用いて、実施例 2 と同様に共重合させ、目的物 200 mg を得た。

【0083】

実施例 10 固定化 α 2, 3-シアル酸転移酵素によるプライマー E へのシアル酸転移

参考例 6 で得た固定化 α 2, 3-シアル酸転移酵素 0.5 ml、CMP-NeuAc 50 mM、塩化マンガン 10 mM を含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) 1.0 ml に実施例 9 で得たプライマー E を 10.3 mg (ラクトース残基で 5 μ mol に相当) 加え、30℃で 24 時間振とうしながら反応させた。反応後、遠心分離することにより反応液を上清として得た後、実施例 5 と同様の方法で生成物を分離し、生成物をそれぞれ 8.5 mg 得た。生成物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、そのスペクトルよりシアル酸転移反応の収率を求めたところ、89%であった。

【0084】

【発明の効果】

本発明のオリゴ糖合成用高分子プライマーを用いることにより、種々のオリゴ糖を効率よく合成でき、自動合成にも適用することができる。

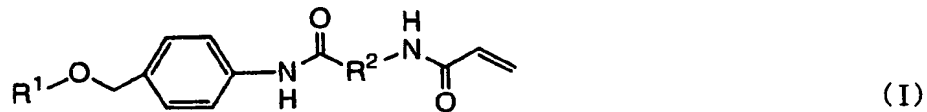
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 種々のオリゴ糖を効率よく合成でき、自動合成方法にも適用することが可能な水溶性高分子プライマー及び該水溶性高分子プライマーを用いたオリゴ糖の製造方法を提供すること。

【解決手段】 一般式 (I) (式中、 R^1 は単糖残基あるいはオリゴ糖残基、 R^2 はメチレン基 4～20 個分の長さを有するリンカーを示す) で表されるアクリルアミド誘導体と少なくとも 1 種類のビニル系単量体とからなる共重合体で、一般式 (I) で表されるアクリルアミド誘導体が全ビニル系共重合体中 10 モル%以下であるオリゴ糖合成用水溶性高分子プライマー。

【化 14】



【選択図】 なし

(I)

特願 2 0 0 3 - 1 2 9 7 3 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 3 1 6 0]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号

氏 名

東洋紡績株式会社